



PCT

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <b>(51) 国際特許分類6</b><br>C07K 14/82, 7/00, C12N 15/00, A61K 39/00  | <b>A1</b> | <b>(11) 国際公開番号</b><br>WO00/06602<br><br><b>(43) 国際公開日</b><br>2000年2月10日(10.02.00)   |
| <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP99/04130<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1999年7月30日(30.07.99)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平10/218093      1998年7月31日(31.07.98)      JP<br><br><b>(71) 出願人 ; および</b><br><b>(72) 発明者</b><br>杉山治夫(SUGIYAMA, Haruo)[JP/JP]<br>〒562-0036 大阪府箕面市船場西2-19-30 Osaka, (JP)<br><b>(72) 発明者 ; および</b><br><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b><br>岡 芳弘(OKA, Yoshihiro)[JP/JP]<br>〒584-0072 大阪府富田林市高辺台3-4-42-202 Osaka, (JP)<br><b>(74) 代理人</b><br>石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.)<br>〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号<br>虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) |           | <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)<br><br>添付公開書類<br>国際調査報告書 |
| <b>(54)Title: CANCER ANTIGENS BASED ON TUMOR SUPPRESSOR GENE WT1 PRODUCT</b><br><br><b>(54)発明の名称</b> 癌抑制遺伝子WT1の産物に基づく癌抗原<br><br><b>(57) Abstract</b><br>Cancer antigens containing as the active ingredient a Wilms' tumor suppressor gene WT1 product or a peptide consisting of 7 to 30 consecutive amino acids in the amino acid sequence of the above gene containing an anchor amino acid binding to major histocompatibility complex (MHC) class I, and cancer vaccines containing the same.   |           |   |

(57)要約

W i l l m s 腫瘍癌抑制遺伝子 W T 1 の産物、又は該アミノ酸配列  
中、主要組織適合性抗原 (M H C) クラス I との結合のアンカーア  
ミノ酸を含む連続する 7 ~ 3 0 個のアミノ酸から成るペプチドを有  
効成分とする癌抗原、及びそれを含む癌ワクチン。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|                 |            |                          |               |
|-----------------|------------|--------------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦     | DM ドミニカ    | KZ カザフスタン                | RU ロシア        |
| AL アルバニア        | EE エストニア   | LC セントルシア                | SD スーダン       |
| AM アルメニア        | ES スペイン    | LI リヒテンシュタイン             | SE スウェーデン     |
| AT オーストリア       | FI フィンランド  | LK スリ・ランカ                | SG シンガポール     |
| AU オーストラリア      | FR フランス    | LR リベリア                  | SI スロヴェニア     |
| AZ アゼルバイジャン     | GA ガボン     | LS レソト                   | SK スロヴァキア     |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB 英国      | LT リトアニア                 | SL シェラ・レオネ    |
| BB バルバドス        | GD グレナダ    | LU ルクセンブルグ               | SN セネガル       |
| BE ベルギー         | GE ジョージア   | LV ラトヴィア                 | SZ スワジランド     |
| BF ブルキナ・ファソ     | GH ガーナ     | MA モロッコ                  | TD チャード       |
| BG ブルガリア        | GM ガンビア    | MC モナコ                   | TG トーゴ        |
| BJ ベナン          | GN ギニア     | MD モルドヴァ                 | TJ タジキスタン     |
| BR ブラジル         | GW ギニア・ビサウ | MG マダガスカル                | TZ タンザニア      |
| BY ベラルーシ        | GR ギリシャ    | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア<br>共和国 | TM トルクメニスタン   |
| CA カナダ          | HR クロアチア   | ML マリ                    | TR トルコ        |
| CF 中央アフリカ       | HU ハンガリー   | MN モンゴル                  | TT トリニダード・トバゴ |
| CG コンゴ          | ID インドネシア  | MR モーリタニア                | UA ウクライナ      |
| CH スイス          | IE アイルランド  | MW マラウイ                  | UG ウガンダ       |
| CI コートジボアール     | IL イスラエル   | MX メキシコ                  | US 米国         |
| CM カメルーン        | IN インド     | NE ニジェール                 | UZ ウズベキスタン    |
| CN 中国           | IS アイスランド  | NL オランダ                  | VN ヴィエトナム     |
| CR コスタ・リカ       | IT イタリア    | NO ノールウェー                | YC ユーゴスラビア    |
| CU キューバ         | JP 日本      | NZ ニュー・ジーランド             | ZA 南アフリカ共和国   |
| CY キプロス         | KE ケニア     | PL ポーランド                 | ZW ジンバブエ      |
| CZ チェッコ         | KG キルギスタン  | PT ポルトガル                 |               |
| DE ドイツ          | KP 北朝鮮     | RO ルーマニア                 |               |
| DK デンマーク        | KR 韓国      |                          |               |

## 明 細 書

## 癌抑制遺伝子 W T 1 の産物に基づく癌抗原

## 技術分野

本発明は、W i l m s 腫瘍の癌抑制遺伝子 W T 1 の産物に基づく癌抗原に関する。この癌抗原は、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、又は固形癌、例えば胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巢癌等、並びにさらには W T 1 を発現するすべての癌に対する抗癌ワクチンとして有用である。

## 背景技術

異物を排除するための免疫機構には、一般に、抗原を認識して抗原提示細胞として機能するマクロファージ、該マクロファージの抗原提示を認識して種々のリンホカインを産生して他の T - 細胞等を活性化するヘルパー T - 細胞、該リンホカインの作用により抗体産生細胞に分化する B - リンパ球等が関与する液性免疫と、抗原の提示を受けて分化したキラー T - 細胞が標的細胞を攻撃し破壊する細胞性免疫とがある。

現在のところ、癌の免疫は主として、キラー T - 細胞が関与する細胞性免疫によるものと考えられている。キラー T - 細胞による癌免疫においては、主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex ; MHC) クラス I と癌抗原との複合体の形で提示された癌抗原を認識した前駆体 T - 細胞が分化増殖して生成したキラー T - 細胞が癌細胞を攻撃し、破壊する。この際、癌細胞は M H C クラス I 抗原と癌抗原との複合体をその細胞表面に提示しており、これがキ

ラー T - 細胞の標的とされる (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev, 146, 167, 1995)。

標的細胞である癌細胞上に M H C クラス I 抗原により提示される前記の癌抗原は、癌細胞内で合成された抗原蛋白質が細胞内プロテアーゼによりプロセッシングされて生成した約 8 ～ 12 個のアミノ酸から成るペプチドであると考えられている (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995)。

現在、種々の癌について抗原蛋白質の検索が行われているが、癌特異抗原として証明されているものは少ない。

W i l m s 腫瘍の癌抑制遺伝子 W T 1 (W T 1 遺伝子) は、W i l m s 腫瘍、無紅彩、泌尿生殖器異常、精神発達遅滞などを合併する W A G R 症候群の解析から W i l m s 腫瘍の原因遺伝子の 1 つとして染色体 11 p 13 から単離された (Gessler, M. ら、Nature, Vol. 343, p. 774-778 (1990)) ものであり、ゲノム D N A は約 50 kb で 10 のエキソンから成り、その c D N A は約 3 kb である。c D N A から推定されるアミノ酸配列は、配列番号: 1 に示す通りである (Mol. Cell. Biol., 11, 1707, 1991)。

W T 1 遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞を W T 1 アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平 9 - 104627 号公報) ことなどから、W T 1 遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、W T 1 遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特願平 9 - 191635)、W T 1 遺伝子は白血病及び固形癌における新しい腫瘍マーカーであるこ

とが判明した。しかしながら、W T 1 遺伝子発現生成物が癌ワクチンとして有用な癌特異抗原であることは立証されていない。

#### 発明の開示

従って本発明は、W T 1 遺伝子発現生成物が癌抗原である可能性を確認し、新規な癌抗原を提供しようとするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、W T 1 遺伝子の発現生成物のアミノ酸配列中で、マウス及びヒトのM H C クラス I 及びM H C クラスIIとの結合において、アンカーアミノ酸として機能すると予想される少なくとも1個のアミノ酸を含有する連続する7～30個のアミノ酸から成るポリペプチドを合成し、これらのペプチドがM H C 蛋白質と結合することを確認すると共に、M H C クラス I 抗原と結合した場合にキラーT-細胞を誘導し、且つ標的細胞に殺細胞効果を及ぼすことを確認して本発明を完成した。

従って本発明は、マウスW T 1 発現産物、又はその部分を含んで成る癌抗原を提供する。好ましい態様において、本発明は、W T 1 のc D N A に対応する配列番号：1に示すアミノ酸配列において、M H C 抗原との結合のためのアンカーアミノ酸を含む6～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原を提供する。

さらに、本発明は、ヒトW T 1 のc D N A に対応する配列番号：2に示すアミノ酸配列において、M H C 抗原との結合のためのアンカーアミノ酸を含む7～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原を提供する。

本発明はまた、上記の癌抗原を含んで成る癌ワクチンを提供する。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 1 における、D<sup>b</sup> 126 ペプチドで免疫した細胞と非免疫細胞のフローサイトメトリーにおける C D 4<sup>+</sup> 細胞と C D 8<sup>+</sup> 細胞の比率を示すグラフである。

図 2 は、実施例 2 における、D<sup>b</sup> 126 ペプチドにより免疫した細胞の、D<sup>b</sup> 126 ペプチドでパルスした標的細胞とパルスしていない標的細胞に対する殺細胞作用を比較したグラフである。

図 3 は、図 2 と同じ意味のグラフである。

図 4 において、A は、実施例 3 における、D<sup>b</sup> 126 ペプチドを用いて誘導した C T L の、D<sup>b</sup> 126 ペプチドをパルスした T 2 細胞に対する殺細胞効果を示し、B は実施例 3 における、W H 187 ペプチドを用いて誘導した C T L の、W H 187 ペプチドをパルスした T 2 細胞に対する殺細胞効果を示すグラフである。

図 5 は、D<sup>b</sup> 126 ペプチドにより誘導された C T L の表面マーカーを F A C S により解析した結果を示すチャートである（C D 19 細胞及び C D 3 細胞）。

図 6 は、C D 4 細胞及び C D 8 細胞についての、図 5 と同様のチャートである。

図 7 は、C D 56 細胞についての図 5 と同様のチャートである。

図 8 は、W H 187 ペプチドにより誘導した C T L の表面マーカーを F A C S により解析した結果を示すチャートである（C D 19 細胞及び C D 3 細胞）。

図 9 は、C D 4 細胞及び C D 8 細胞についての、図 8 と同様のチャートである。

図 10 は、C D 56 細胞についての、図 8 と同様のチャートである。

図 11 は、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L による、D<sup>b</sup> 126 ペ

チドをパルスした T 2 細胞に対する特異的細胞溶解に対する抗 H L A - A 2 . 1 抗体の影響を示すグラフである。

図 1 2 は、W T 1 を発現している標的細胞又は W T 1 を発現していない標的細胞に対する、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解活性を比較したグラフである。a は E : T 比が 7 . 5 : 1 の場合の結果を示し、b は E : T 比が 1 5 : 1 の場合の結果を示す。

図 1 3 は、生来的に W T 1 を発現する腫瘍細胞 ( F B L 3 ) 及び W T 1 を発現しない腫瘍細胞 ( R M A ) に対する、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解効果を比較したグラフである。

図 1 4 は、W T 1 遺伝子により形質転換された細胞及び形質転換されていない同じ細胞に対する、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解効果を比較したグラフである。

図 1 5 は、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L の細胞毒性に対する、抗 H - 2 クラス I 抗体の影響を示すグラフである。

図 1 6 は、D<sup>b</sup> 126 ペプチドをワクチンとして使用してマウスを免疫した場合の、インビボ免疫効果を示すグラフである。

図 1 7 は、W T 1 を発現するプラスミドを D N A ワクチンとしてマウスに投与した場合の免疫効果を示すグラフである。

図 1 8 は、図 1 7 の対照であって、W T 1 を発現しないプラスミドを投与した場合に免疫効果が生じないことを示すグラフである。

#### 発明の実施の形態

本発明においては、癌抗原ペプチドを設計する際の基礎として、マウス M H C クラス I の K<sup>b</sup> 及び D<sup>b</sup> 、並びにヒト H L A の A \* 0 2 0 1 を選択し、これらと高い親和性を有すると予想されるペプチドを選択した。

Immunogenetics Vol. 41, p. 178-228 (1995) の記載から、K<sup>b</sup> へ

の結合のアンカーアミノ酸として5番目のP h e及びT r y並びに8番目のL e u及びM e t等が予想され、またD<sup>b</sup>への結合のアンカーアミノ酸として5番目のA s n並びに9番目のM e t及びI l e等が予想される。

また、癌細胞の表面においてM H CクラスIにより提示される癌抗原ペプチドのサイズはおよそ8～12個であることが知られている。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、配列番号：1に示すW T 1遺伝子産物のアミノ酸配列において、アンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸から成るペプチドである。アミノ酸の数は好ましくは8～12個であり、例えば8又は9個である。

本発明においては、その具体例として、M H CクラスIのK<sup>b</sup>に結合するペプチドとして、アミノ酸8個からなる下記ペプチド：

K<sup>b</sup> 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (配列番号：3)

K<sup>b</sup> 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号：4)

M H CクラスIのD<sup>b</sup>に結合するペプチドとして、アミノ酸9個から成る下記のペプチド：

D<sup>b</sup> 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：5)

D<sup>b</sup> 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (配列番号：6)

D<sup>b</sup> 235 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

を使用した。上記配列において下線を付したアミノ酸がアンカーとして機能すると予想されるアミノ酸である。

次に、これらのペプチドの内、K<sup>b</sup> 45及びK<sup>b</sup> 330についてはM H CクラスIのK<sup>b</sup>との結合性を、D<sup>b</sup> 126、D<sup>b</sup> 221及びD<sup>b</sup> 235についてはM H CクラスIのD<sup>b</sup>との結合性を、抗原ペプチドを提示していないが(e m p t y)、K<sup>b</sup>及びD<sup>b</sup>は発現されているセルライン(R M A - S)を用いて測定した。

すなわち、R M A - Sを26℃にて培養してM H CクラスIを高



発現せしめ、この培養細胞を被験ペプチド溶液と 37℃にて1時間インキュベートした。これにより、ペプチドと結合しないMHC分子は不安定になって細胞表面から消失し、ペプチドを結合したMHCクラスI分子のみが残る。次に、MHCクラスI (K<sup>b</sup>, D<sup>b</sup>) を認識する蛍光標識モノクローナル抗体によりRMA-S細胞を染色した。最後に、FACS解析により、細胞当りの平均蛍光量から結合解離定数を計算した (Immunol. Lett., 47, 1, 1995)。

その結果、次の結果が得られた。

|                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| K <sup>b</sup> 45  | - 4. 5 7 8 4 8 3 8 (log) |
| K <sup>b</sup> 330 | - 5. 7 6 1 7 7 3 2       |
| D <sup>b</sup> 126 | - 6. 2 8 3 4 9 6 8       |
| D <sup>b</sup> 221 | - 5. 7 5 4 5 3 9 8       |
| D <sup>b</sup> 235 | - 6. 1 4 5 7 6 2 4       |

以上の通り、いずれもK<sup>b</sup>又はD<sup>b</sup>と強～中程度の結合親和性 (kd値) を有しているが、最も高い結合親和性を示すD<sup>b</sup> 126 ペプチドを以後の実験において用いた。

また、ヒトについては、Immunogenetics Vol. 41, p. 178-228 (1995) の記載から、ヒトのHLA-A\* 0201への結合アンカーアミノ酸として、N-末端から2番目のLeu及びMet、並びにN-末端から9番目のVal及びLeuが予想される。そこで、ヒトWT1蛋白質のアミノ酸配列 (Mol. Coll. Biol. Vol. 11, p. 1707-1712, 1991) (配列番号: 2) 中で、上の条件に合致する、9個のアミノ酸から成る2種類のペプチドを合成した。

D<sup>b</sup> 126: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号: 5)  
(マウスにおけるD<sup>b</sup> 126 の配列と同じ)

WH 187: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号: 8)  
(下線はアンカーアミノ酸を示す。)

上記ペプチドと、H L A - A \* 0 2 0 1 との結合能を次のようにして測定した。

上記ペプチドと、e m p t y な H L A - A \* 0 2 0 1 をもつ T 2 細胞 (J. Immunol., 150, 1763, 1993; Blood, 88, 2450, 1996) を 3 7 ° C 、 1 時間インキュベート後、H L A - A 2 . 1 を認識する蛍光標識モノクローナル抗体で、T 2 細胞を染色し、F A C S 解析で、細胞当りの平均蛍光量から結合解離定数を計算した。

| 結 合 能              |                             |
|--------------------|-----------------------------|
| ペプチド               | K d (M)                     |
| D <sup>b</sup> 126 | 1 . 8 9 × 1 0 <sup>-5</sup> |
| WH 187             | 7 . 6 1 × 1 0 <sup>-5</sup> |

2 種類のペプチドは、ともに中等度以上の結合親和性を有する。

ヒト M H C に対応するペプチドとして、上記 D<sup>b</sup> 126 及び W H 1 87 を用いて、以下の実験を行った。

本発明はまた前記抗原を有効成分とする癌ワクチンに関する。このワクチンは、W T 1 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防又は治療のために使用することができる。このワクチンは、経口投与、又は非経口投与、例えば腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与等により投与することができる。

さらに、本発明のワクチンの投与方法として、患者の末梢血から単核球を集め、その中から樹状細胞を取り出し、本発明のペプチドをパルスして患者に皮下投与などで患者に戻す方法も行われる。

ワクチンは、前記有効成分としての投与ペプチドのほかに、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバンド、例えば

水酸化アルミニウムのごとき鉱物ゲル；リソレシチン、プルロニックポリオールのごとき界面活性剤；ポリアニオン；ペプチド；又は油乳濁液を含むことができる。あるいは、リポゾーム中へ混合し、又は多糖及び／又はワクチン中に配合される他の集合体を含むことができる。投与量は一般に、1日当り0.1  $\mu$ g ~ 1 mg/kgである。

本発明はまた、上記のポリペプチドワクチンをコードするDNAもワクチン（DNAワクチン）として使用することができる。すなわち、WT1又はその部分をコードする核酸、好ましくはDNAを、適切なベクター、好ましくは発現ベクターに挿入した後、動物に投与することにより、癌免疫を生じさせることができる。その具体例を実施例9に示す。

#### 実施例

次に、実施例により、本発明のペプチドが癌抗原及び癌ワクチンとして有用なことを、明らかにする。

##### 実施例 1

D<sup>b</sup> 126 ペプチド100  $\mu$ g、ブタ由来の乳酸脱水素酵素（LDH）200  $\mu$ g、及びフロイントの不完全アジュバント0.5 mlをC57BL/6マウスの腹腔内に、1週毎に2回注射して免疫処理した。この免疫処理の1週間後にマウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞の浮遊液を調製した。他方、D<sup>b</sup> 126 ペプチドをパルスした同系マウスの放射線照射脾細胞を、ペプチド50  $\mu$ g/mlを含む溶液と37℃にて30分間インキュベートし、抗原提示細胞とした。

前記の免疫処理した脾細胞と放射線照射した脾細胞を混合して、5日間共培養し、キラーT細胞を誘導調製した。他方D<sup>b</sup> 126 ペプチドによりパルス（100  $\mu$ g/mlのペプチド溶液と37℃にて30分間インキュベート）した Europium ラベル EL-4 細胞（K

及び D<sup>b</sup> を発現している) を標的細胞とし、通常の方法を用いて、次の操作により K i l l i n g アッセイを行った (表 1)。

その結果、D<sup>b</sup> 126 をパルスした E L - 4 細胞を標的にした場合は、殺細胞効果が見られたが、D<sup>b</sup> 126 をパルスしていない E L - 4 細胞標的した場合は、殺細胞効果はほとんど見られなかった。

表 1

|       | マウス A  | マウス B  |
|-------|--------|--------|
| ペプチド+ | 76.6 % | 37.2 % |
| ペプチド- | 4.9 %  | 0.9 %  |

E / T 比 40 : 1

次に、K i l l i n g アッセイにより有意な殺細胞効果を示した脾細胞試料を、蛍光標識した抗 C D 4 抗体又は抗 C D 8 抗体で染色しフローサイトメトリーにより、C D 4 及び C D 8 の発現を解析した。

その結果、図 1 に示すごとく、非免疫対照細胞に比べて、D<sup>b</sup> 126 ペプチドで免疫処理した脾細胞においては、キラー T - 細胞により代表される C D 8 <sup>+</sup> 細胞が増加し、ヘルパー T - 細胞等により代表される C D 4 <sup>+</sup> 細胞に対する C D 8 <sup>+</sup> 細胞の比率が逆転増加していた。

## 実施例 2

C 5 7 B L / 6 マウスの骨髄由来の樹状細胞 ( d e n d r i t i c c e l l s ; D C ) を次の様にして調製した。常法に従い、骨髄細胞を G M - C S F 存在下で培養し、骨髄由来樹状細胞を調製した ( J. Exp. Med. 182, 255, 1995)。

7 日間培養した樹状細胞と 1 0 μ M の O V A I I ( O v a l b u m

i n II ) 及び  $1 \mu\text{M}$  の D<sup>b</sup> 126 ペプチドと共に 3 時間インキュベートした後、洗浄した。

次に、C 5 7 B L / 6 マウスの f o o t p a d s と h a n d s とに上記 D C 細胞を皮内注射し、5 日目に所属リンパ節を取り出し、細胞浮遊液を調製した。他方、D<sup>b</sup> 126 ペプチドでパルスし、放射線照射した B 7 . 1 - R M A - S 細胞 ( C o - s t i m u l a t o r y m o l e c u l e である B 7 . 1 をコードする遺伝子をトランスフェクトした R M A - S 細胞) を調製した。

次に、上記のリンパ節由来細胞浮遊液と B 7 . 1 - R M A - S 細胞とを混合して培養することによりインビトロで再刺激した。

次に、インビトロでの再刺激の 5 日目に、<sup>51</sup>C r でラベルした R M A - S 細胞を標的として K i l l i n g アッセイを行った。再刺激 5 日目に回収されたリンパ球全体の 1 / 8 をエフェクター細胞として用いた時を、最大の E / T 比 ( 1 . 0 ) とした。

図 2 及び図 3 に示すごとく、D<sup>b</sup> 126 ペプチドにより免疫されたマウスのリンパ節由来のエフェクター細胞は、該ペプチドでパルスされた標的細胞を殺したのに対して、該ペプチドでパルスされない標的細胞は殺さなかった。

また、実施例 1 と同様にして行ったフローサイトメトリーで C D 4 <sup>+</sup> 細胞と C D 8 <sup>+</sup> 細胞の比を解析したところ、C D 4 : C D 8 = 1 : 1 . 4 ~ 1 . 7 であり、非免疫マウス細胞 ( 対照 ) に比べて、D<sup>b</sup> 126 ペプチドで免疫されたマウス細胞においては、C D 8 <sup>+</sup> 細胞が増加し、C D 4 <sup>+</sup> 細胞 : C D 8 <sup>+</sup> 細胞の比 ( 対照細胞においては約 2 : 1 ) が免疫された細胞においては逆転していた。

### 実施例 3

ペプチド D<sup>b</sup> 126 又は W H 187 (  $40 \mu\text{g} / \text{ml}$  ) と 1 時間インキュベートした後に放射線照射した T 2 細胞  $5 \times 10^4$  個と H L A -

A\* 0201をもつ健常人の末梢単核球  $1 \times 10^6$  個とを共培養した。一週間後、ペプチド ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) と1時間インキュベートした後に放射線照射したT2細胞を上記の共培養系に加え、再刺激を行なった。その翌日から、ヒトIL-2 (最終濃度  $100 \text{ JRU}/\text{ml}$ ) を培養液に加えた。

以後、ペプチドでパルス後に放射線照射されたT2細胞での刺激を5回くり返した後、ペプチドをパルスされたT2細胞、あるいは、ペプチドをパルスされていないT2細胞を標的にして、Killing assayを行なった。また、誘導されたCTLの表面マーカーをFACS解析した。

Killing assayは常法に従いEuropiumでラベルしたT2細胞にペプチドをパルスしたものを標的として行った。

Effector : Target比 (E/T ratio) は10 : 1  
共培養時間 : 3時間

培養液中のペプチド濃度 :  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$

結果を図4に示す。図4のAはD<sup>b</sup> 126 ペプチドを用いて誘導したCTLの、D<sup>b</sup> 126 ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示し、図4のBはWH 187ペプチドを用いて誘導したCTLの、WH 187ペプチドをパルスしたT2細胞に対する殺細胞効果を示す。

いずれの場合でも、ペプチドをパルスしたT2細胞に対してより強い殺細胞効果が見られた。

FACS解析の結果を図5～図10に示す。図5～7にD<sup>b</sup> 126 ペプチドで誘導したヒトのCTLの結果を示し、ほとんどの細胞がCD8陽性であった。図8～図10はWH 187ペプチドで誘導されたヒトのCTLの結果を示す。CD4陽性細胞とCD8陽性細胞が

ほぼ同数であった。

#### 実施例 4

D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L の細胞溶解活性の M H C 拘束性を試験するため、ペプチドでパルスした T 2 細胞に対する C T L の細胞毒性活性をブロックするために抗 H L A - A 2 . 1 モノクローナル抗体を用いた。D<sup>b</sup> 126 ペプチドでパルスした T 2 細胞の特異的細胞溶解を 5 : 1 の E / T 比において、H L A - A 2 . 1 分子に対するブロッキングモノクローナル抗体 ( B B 7 . 2 ) の存在下又は不存在下で測定した。

結果を図 1 1 に示す。この図において\* 印は抗 H L A - A 2 . 1 モノクローナル抗体の代りに抗 H - 2 K<sup>b</sup> モノクローナル抗体を使用した結果を示す。この図から明らかな通り、6 0 μ g / ml の抗 H L A - A 2 . 1 モノクローナル抗体の添加により、細胞毒性は、T 2 細胞の細胞溶解のバックグラウンドまで低下した。アイソタイプが同じ無関係のモノクローナル抗体 ( 抗 H - 2 K<sup>b</sup> モノクローナル抗体 Y 3 ) は T 2 細胞の溶解に効果を有しなかった。

#### 実施例 5

D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L が、生来的に W T 1 を発現する H L A - A 2 . 1 陽性白血病細胞を殺すことができるか否かを試験した。標的細胞として T F 1 細胞 ( W T - 1 を発現し、H L A - A 2 . 1 陽性 ) 、J Y 細胞 ( W T 1 を発現せず、H L A - A 2 . 1 陽性 ) 、及び M o l t - 4 細胞 ( W T 1 を発現し、H L A - A 2 . 1 陰性 ) を用い、7 . 5 : 1 ( a ) 又は 1 5 : 1 の E : T 比において、細胞毒性を測定した。

結果を図 1 2 に示す。D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L は生来的に W T 1 を発現し H L A - A 2 . 1 陽性の白血病細胞 T F 1 に対して有意な細胞毒性を示したが、M o l t - 4 ( W T 1 を発現し、H L

A - A 2. 1 - 陰性) 又は J Y 細胞 (W T 1 を発現せず、H L A - A 2. 1 - 陽性) に対してはバックグラウンドレベルの細胞溶解を示した。

#### 実施例 6

D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L が、生来的に W T 1 を発現する腫瘍細胞を認識しそして細胞溶解するか否かを試験した。W T 1 を発現する腫瘍細胞 (F B L 3) もしくは W T 1 を発現しない腫瘍細胞 (R M A) (図 1 3)、又は W T 1 遺伝子をトランスフェクトされた C 1 4 9 8 細胞もしくは T W 1 遺伝子をトランスフェクトされていない C 1 4 9 8 細胞 (図 1 4) について、特異的細胞溶解を図 1 3 及び図 1 4 に示す E / T 比において測定した。

図 1 3 に示す通り、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L は、生来的に W T 1 を発現する F B L 3 細胞を溶解したが W T 1 を発現しない R M A 細胞を溶解しなかった。図 1 4 に示す通り、さらに、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L は、W T 1 を発現しない親 C 1 4 9 8 細胞に比べて、マウス W T 1 遺伝子をトランスフェクトされた C 1 4 9 8 細胞を殺した。これにより、C T L による殺細胞のために標的化された分子が確かに W T 1 ペプチドであることが確認された。これらの結果は、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L が、W T 1 蛋白質の細胞内プロセッシングにより天然に産生され、そして W T 1 発現細胞の H - 2 D<sup>b</sup> 分子上に存在する D<sup>b</sup> 126 ペプチド又は関連ペプチドを認識することができることを示唆している。

#### 実施例 7

C T L の細胞溶解活性が M H C 拘束性であるか否かを試験するため、H - 2 クラス I 分子に対する抗体の存在下で測定を行った。すなわち、D<sup>b</sup> 126 ペプチド特異的 C T L による、D<sup>b</sup> 126 ペプチドでパルスした R M A - S 細胞、H - 2 K<sup>b</sup> (2 8. 1 3. 3 S)、



H-2 D<sup>b</sup> (28.11.5S) 又は H-2 L<sup>d</sup> (MA143) に対する、タイターを調整したモノクローナル抗体の存在下で試験した。対照モノクローナル抗体としてアイソタイプが一致したモノクローナル抗体を使用した。

結果を図 15 に示す。H-2 D<sup>b</sup> に対する抗体の濃度の増加に依存して、D<sup>b</sup> 126 ペプチドでパルスした RMA-S 細胞に対する C T L の細胞溶解活性が抑制されたが、H-2 K<sup>b</sup> 又は H-2 L<sup>d</sup> に対する抗体は C T L の細胞溶解活性を抑制しなかった。これらの結果は、C T L が H-2 D<sup>b</sup> 拘束的に細胞溶解活性を発揮することを示している。

#### 実施例 8

D<sup>b</sup> 126 ペプチドによる積極的免疫化により生体内腫瘍免疫が惹起されるか否かを試験した。D<sup>b</sup> 126 ペプチドによりパルスされた L P S 活性化脾細胞 (図 16 中の実線)、L P S 活性化脾細胞のみ (網線)、又はリン酸緩衝液のみ (P B S) (破線) により、1 週間に 1 回マウスを免疫した。3 週間の免疫の後、 $3 \times 10^7$  個の F B L 3 白血病細胞を腹腔内注射した。

結果を図 16 に示す。D<sup>b</sup> 126 ペプチドにより免疫されたマウスは腫瘍チャレンジを克服しそして生存したが、非免疫マウス及び L P S 活性化脾細胞のみで免疫されたマウスは腫瘍チャレンジを拒絶することができず、死亡した。免疫されたマウス及び非免疫マウスの両方について、腫瘍細胞の前記腹腔内接種の後 3 日間で腹水が観察された。非免疫マウスにおいては腹水が増加し続け、そしてマウスは死んだ。他方、免疫マウスにおいては、腹水はその後徐々に減少し、マウスは腫瘍チャレンジを完全に拒絶し、そして生存した。非免疫マウスにおいて、自然的退行 (r e g r e s s i o n) が時々観察された。この退行は、F r i e n d 白血病ウイルス (F B L

3 白血病細胞はこのウイルスにより形質転換される) に対して特異的なCTLの自然的誘導によるものと予想される。なぜなら、このようなCTL誘導は、C57BL/6マウスにおいて時おり観察されるからである。

#### 実施例9 DNAワクチン

6～8週齢のC57BL/6マウスに、100 $\mu$ gのWT1を発現するプラスミッドDNA(マウスWT1 cDNA (Molecular and Cellular Biology, vol.11, No.3, p.1707-1712(1991), p.1709の左欄)のSun 3A1断片をCMV-IEプロモーターに連結し、WT1を持続発現するプラスミッドを作製)(Proc.Natl.Acad.Sci., USA., 92, 11105-11109(1995))を10日毎に、計3回筋肉注射した。最後の筋肉注射の10日後、マウスの脾を取り出し脾細胞を調整し、この脾細胞と、WT1を発現しているmWT1 C1498細胞(40Gy放射線照射)と6日間、37℃で共培養を行なった後、標的細胞として、WT1を発現しているC1498(PM5G-mWT1)とWT1を発現していないC1498(PM5G)を用いて、Killing assay(Europiumでラベル)を行った。なお、C1498はWT1を発現しないマウス骨髄性白血病細胞株である。

WT1を発現している、C1498(PM5G-mWT1)細胞を殺すが、WT1を発現していない細胞は殺さない細胞毒性Tリンパ球(CTL)が誘導された。

結果を図17に示す。

対照として、上記と同様の実験を行ったが、WT1を発現しているプラスミッドの代りに、WT1を発現しない(WT1 cDNAをもたない)プラスミッドをマウスに筋肉注射した。上記の実験と同じように脾細胞を採取し、WT1を発現しているC1498(PM

5 G-mWT1) で *in vitro* 刺激後、Killing assay を行った。

図18に示す通り、WT1 cDNA をもたないコントロールプラスミッドDNAの筋肉注射からは、WT1 タンパク特異的CTLは誘導されなかった。

上記の結果から、本発明のペプチドは確かに癌抗原として機能し、癌細胞に対するキラーT-細胞（癌細胞傷害性T細胞）を誘導増殖させたことが立証された。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、WT1 遺伝子の発現の上昇を伴う白血病及び固形癌に対する癌ワクチンとして有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 癌抑制遺伝子W T 1 の産物又はその部分ペプチドを活性成分とする癌抗原。

2. 配列番号：1 のアミノ酸配列において、M H C 分子に結合するために必要なアンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸からなるペプチド、又は配列番号：2 のアミノ酸配列において、M H C 分子に結合するのに必要なアンカーアミノ酸を含む、連続する7～30個のアミノ酸から成るペプチド、を活性成分とする請求項1に記載の癌抗原。

3. 前記抗原が、癌抑制遺伝子W T 1 の高発現をもたらす癌の抗原である、請求項1又は2に記載の癌抗原。

4. 前記癌が、白血病、骨髓異形成症候群、悪性リンパ腫、多発性骨髓腫、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌又は卵巢癌である、請求項1又は2に記載の癌抗原。

5. 前記ペプチドが、

K<sup>b</sup> 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (配列番号：3)

K<sup>b</sup> 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号：4)

D<sup>b</sup> 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：5)

D<sup>b</sup> 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (配列番号：6)

D<sup>b</sup> 235 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

WH 187 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号：8)

のいずれかである、請求項1～4のいずれかに記載の癌抗原。

6. 前記ペプチドが、

D<sup>b</sup> 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：5)

、又は

WH 187 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (配列番号 : 8)  
である、請求項 5 に記載の癌抗原。

7. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の癌抗原を含んで成る癌  
ワクチン。

Fig.1

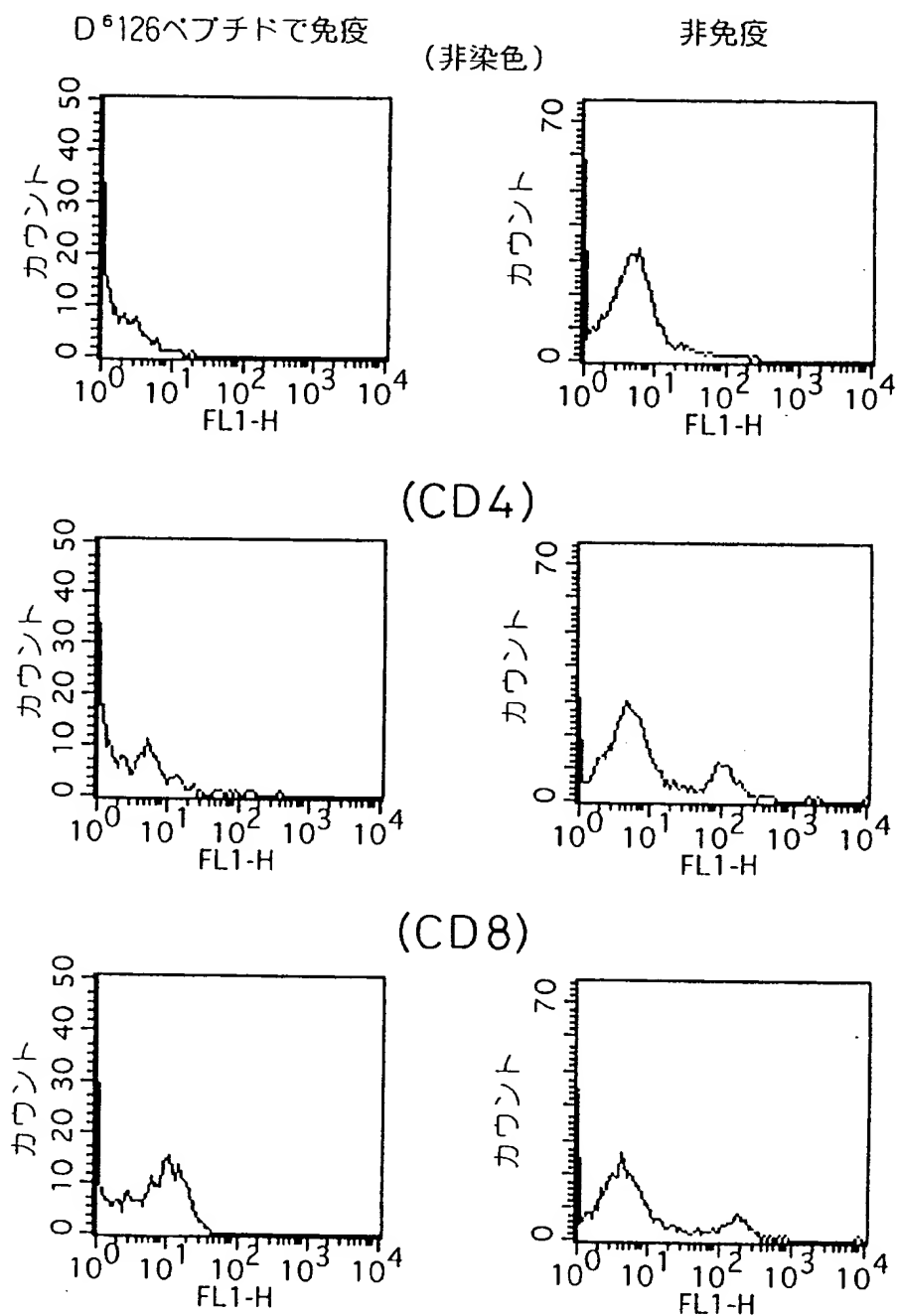
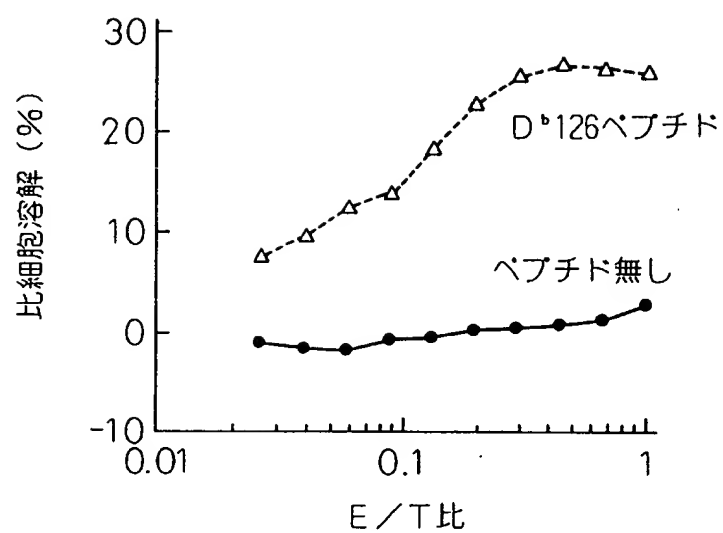


Fig. 2

マウス 1



マウス 2

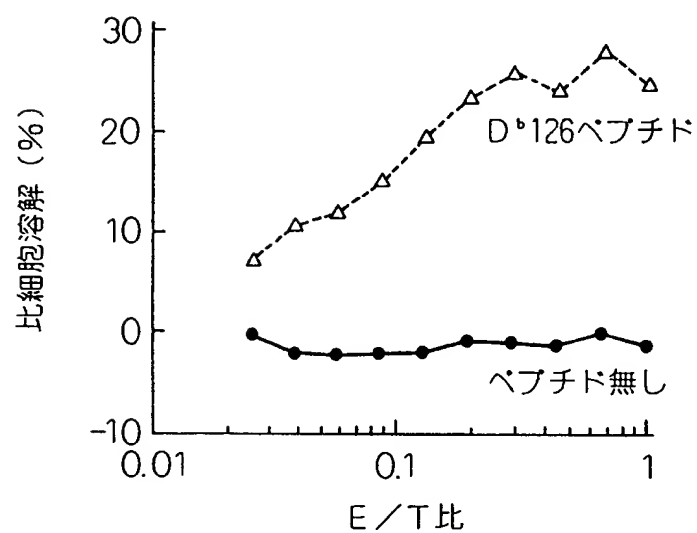
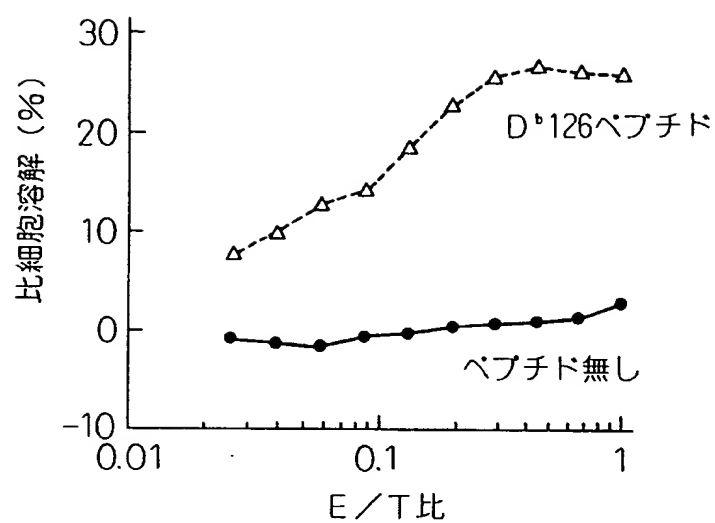


Fig.3

マウス3



マウス4

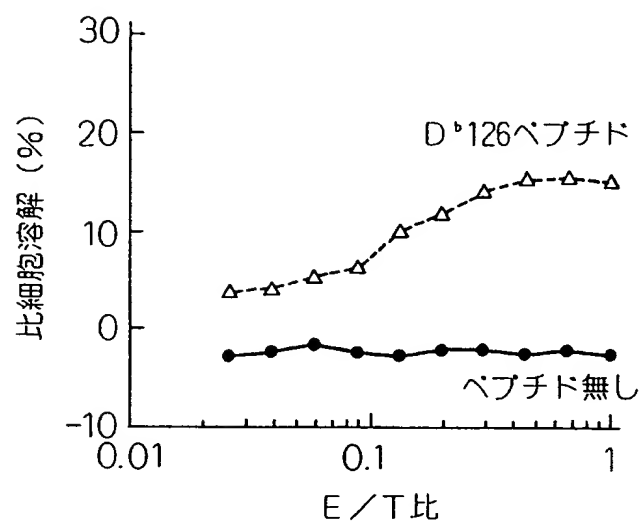




Fig. 4

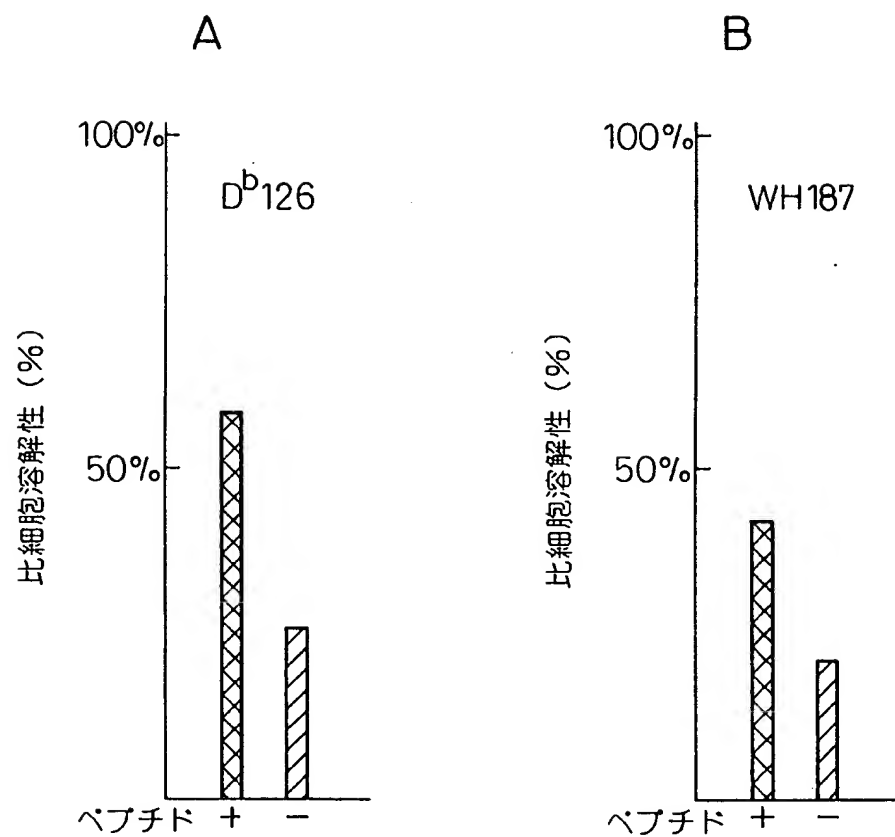


Fig. 5

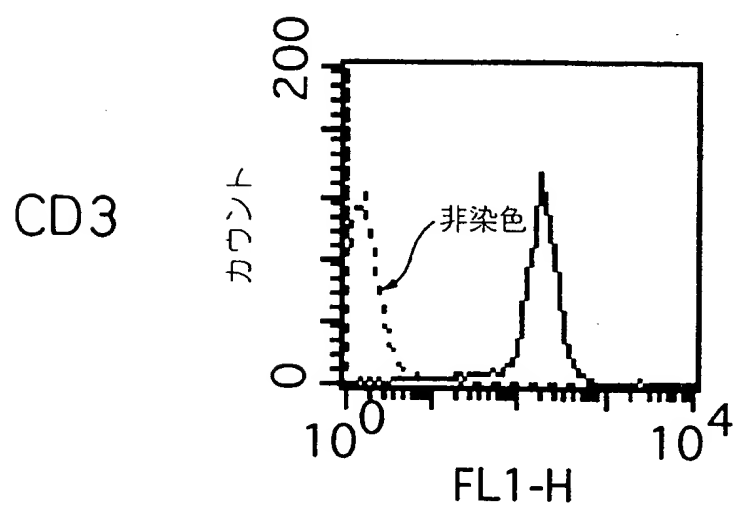
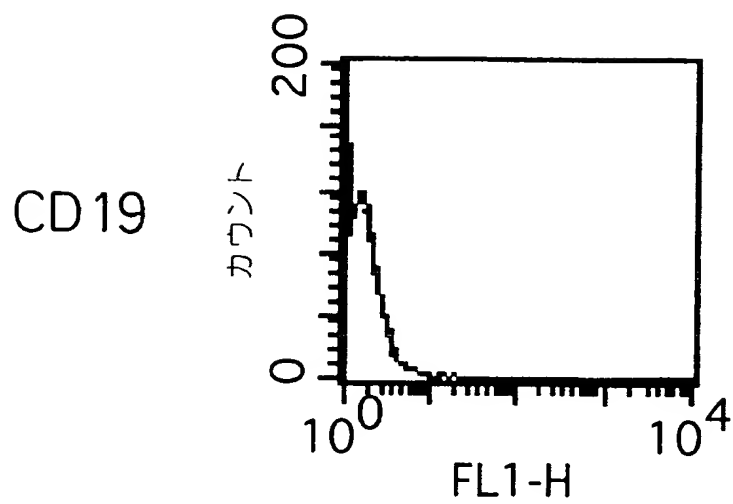


Fig.6

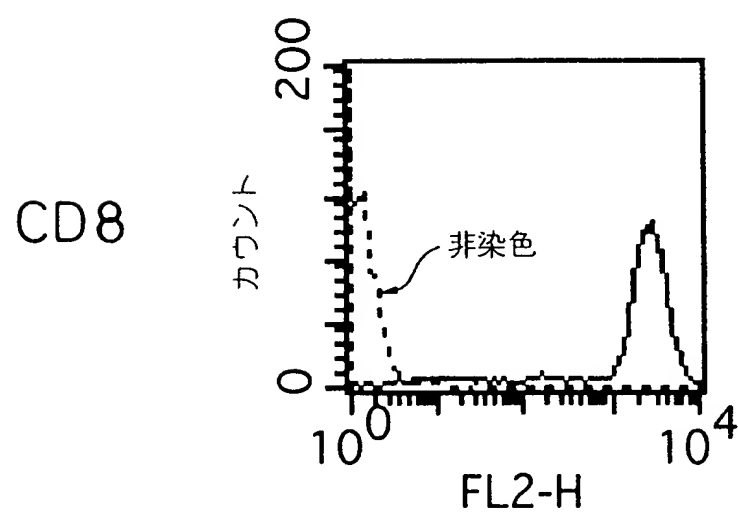
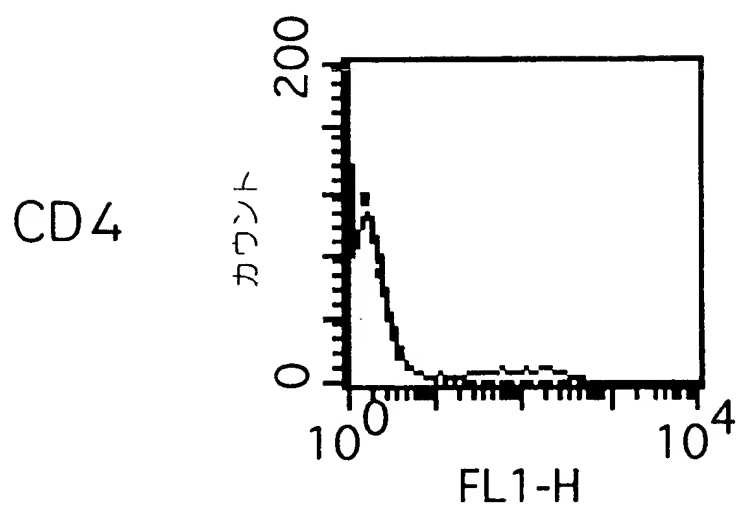


Fig.7

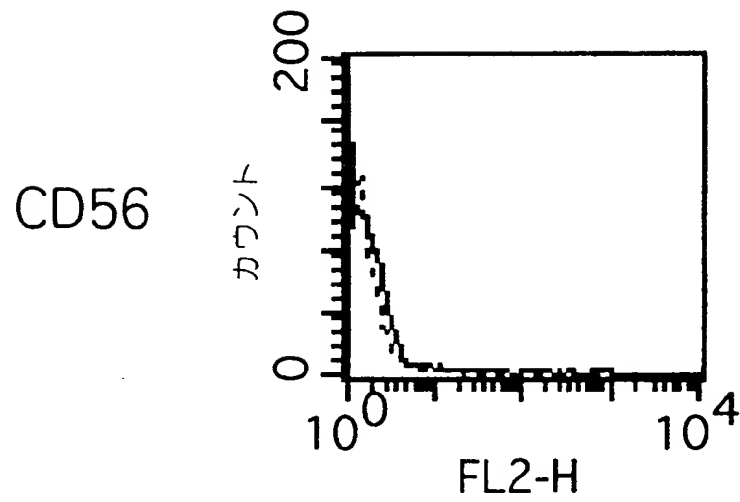


Fig. 8

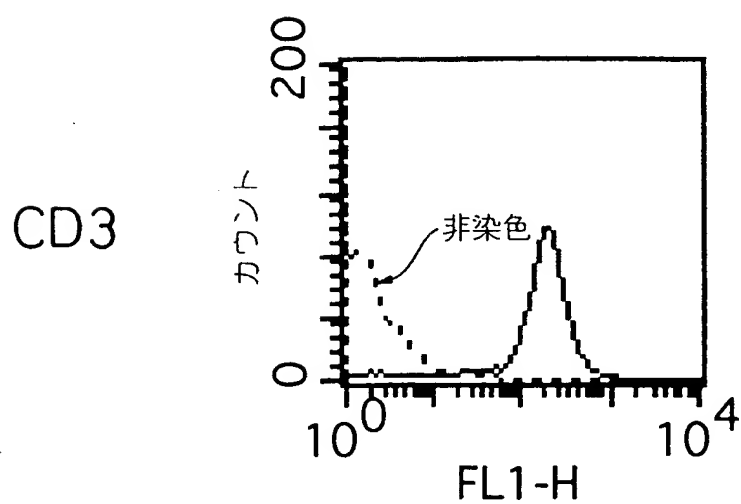
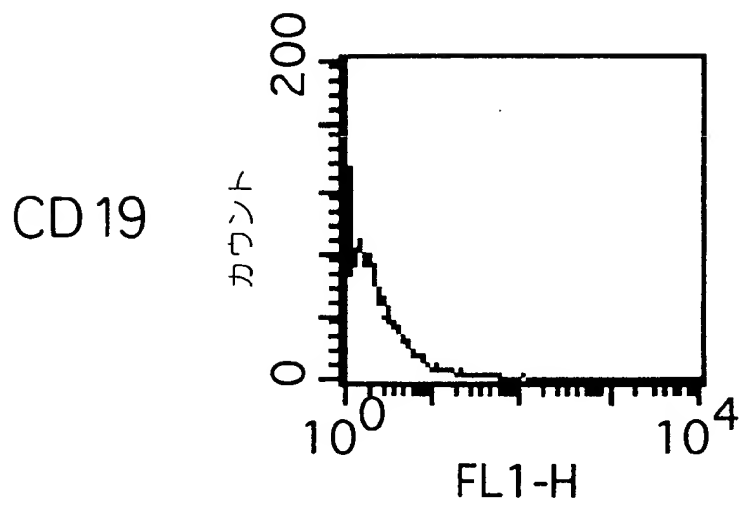


Fig. 9

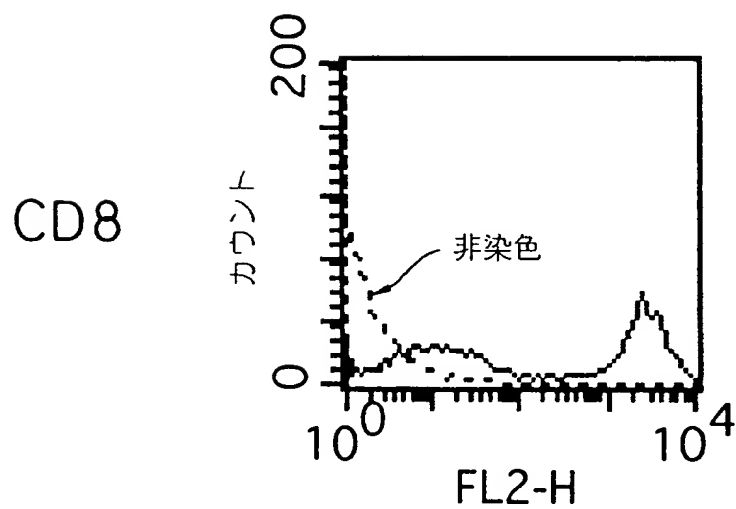
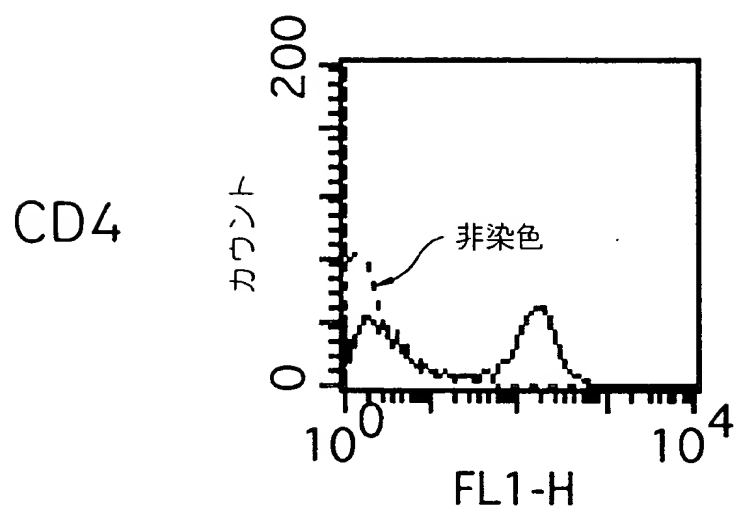


Fig. 10

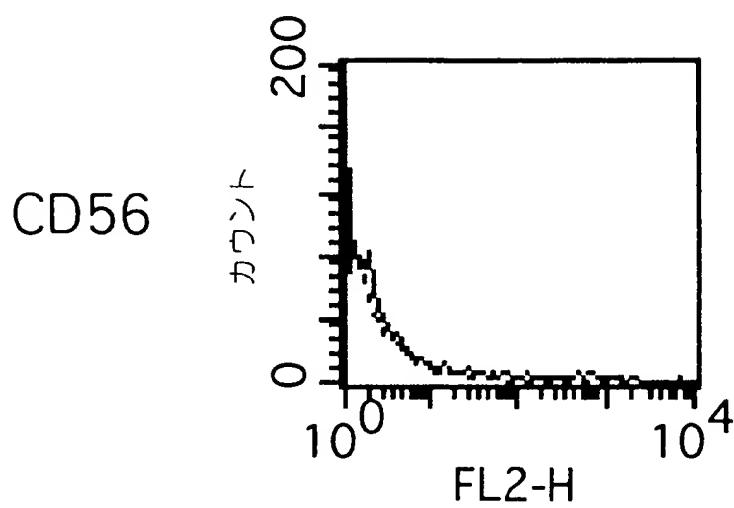


Fig.11

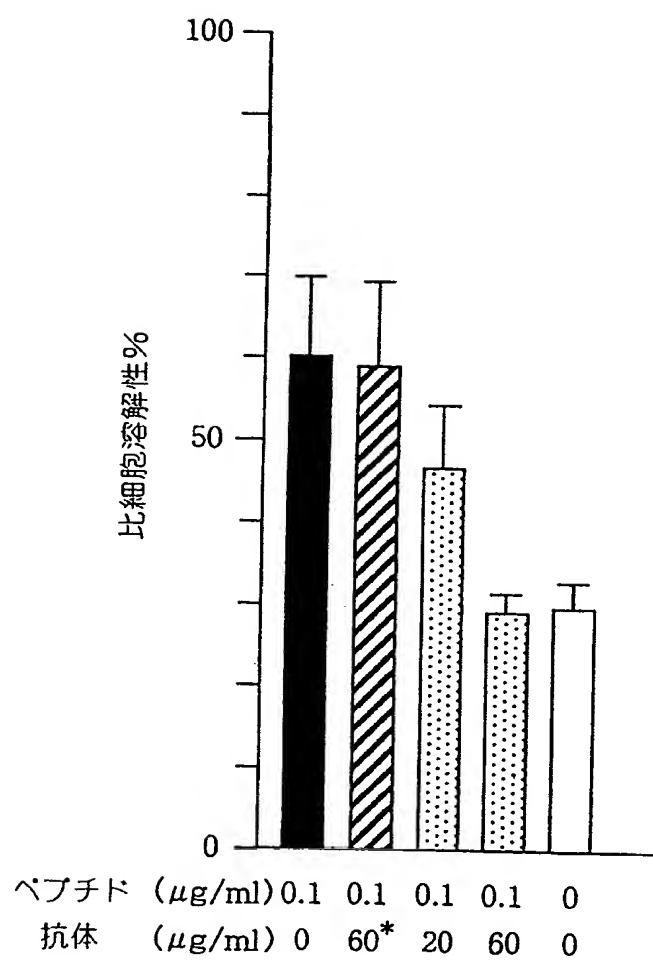




Fig.12

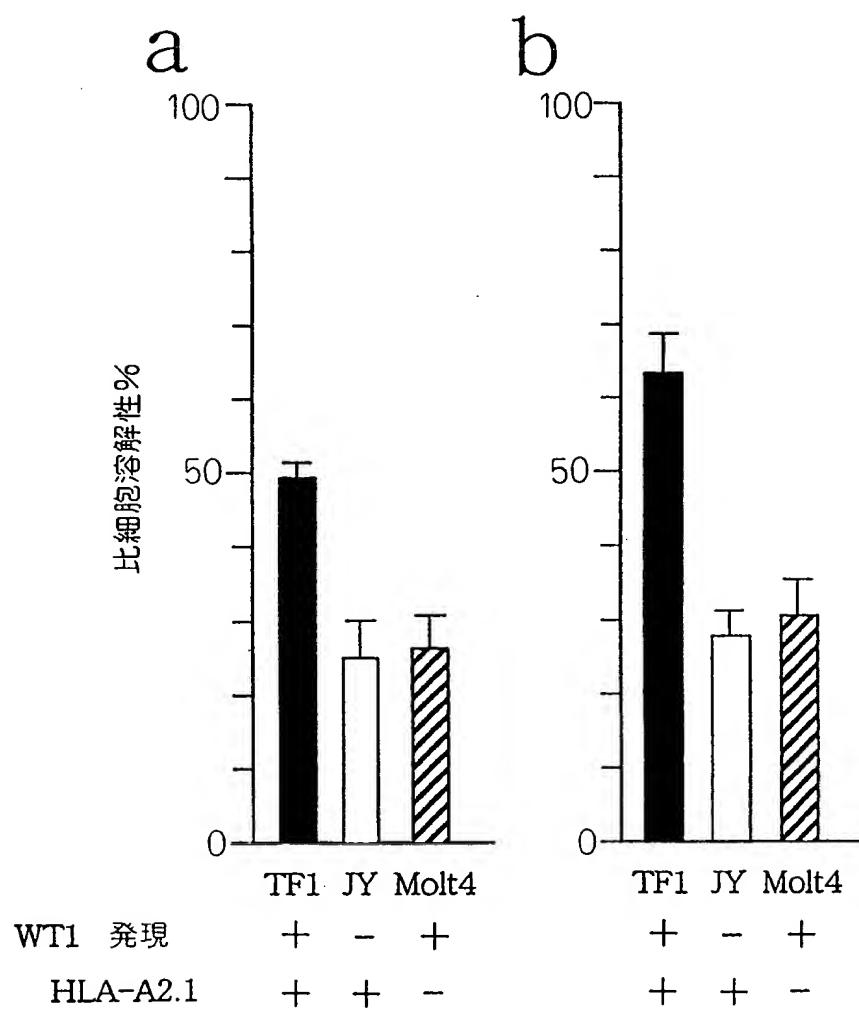


Fig.13

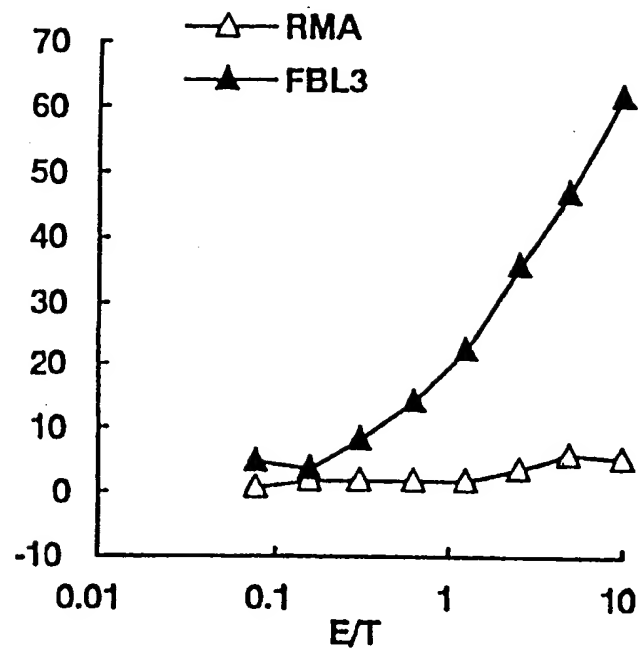


Fig.14

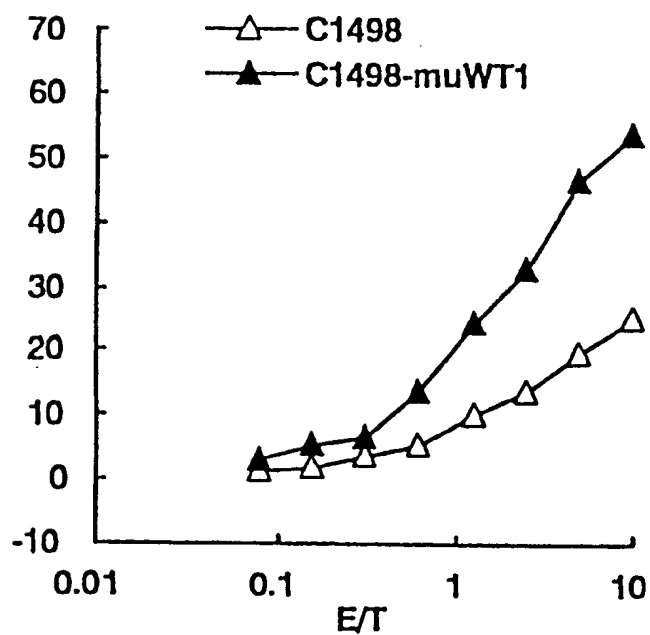


Fig.15

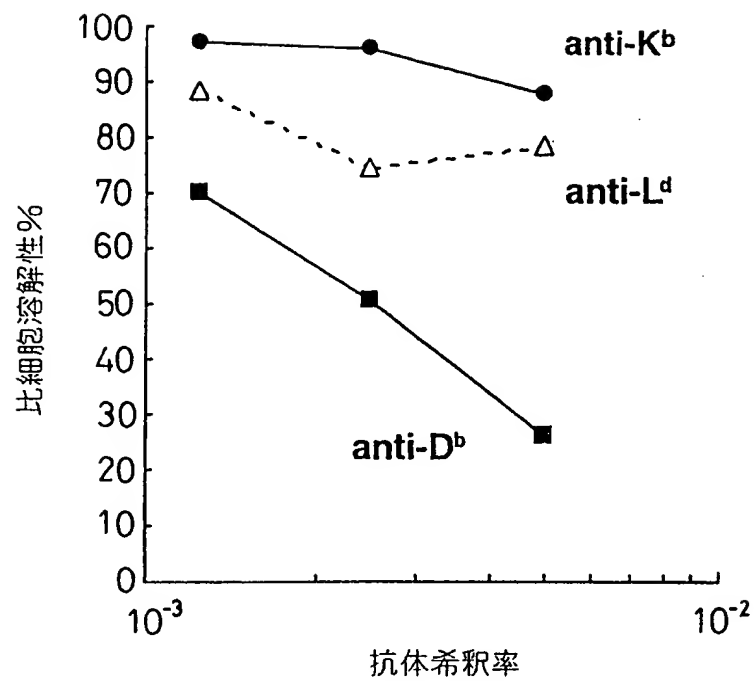
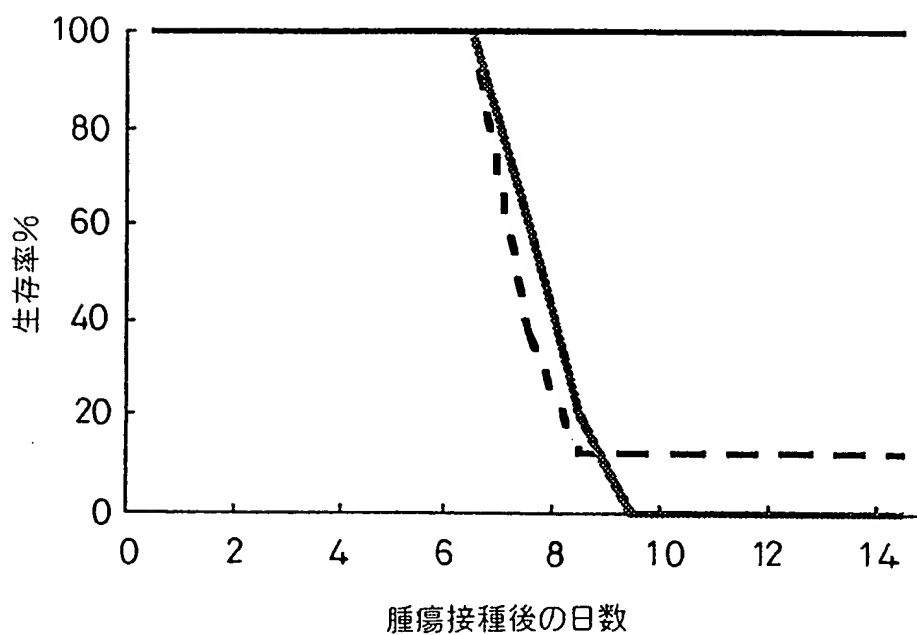


Fig.16

 $\frac{14}{16}$ 

差替え用紙 (規則26)

Fig.17

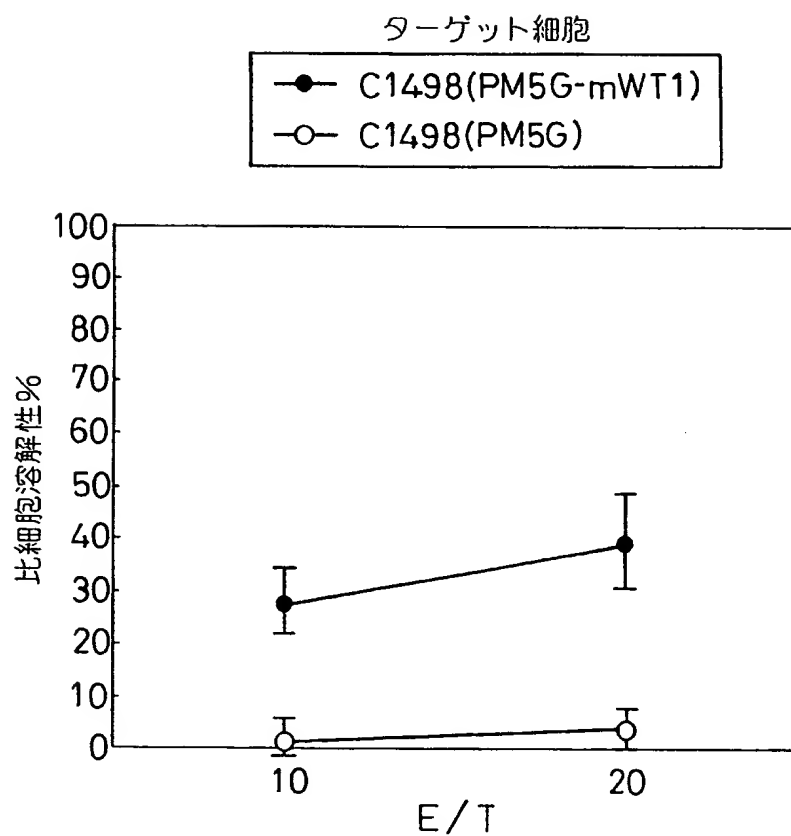
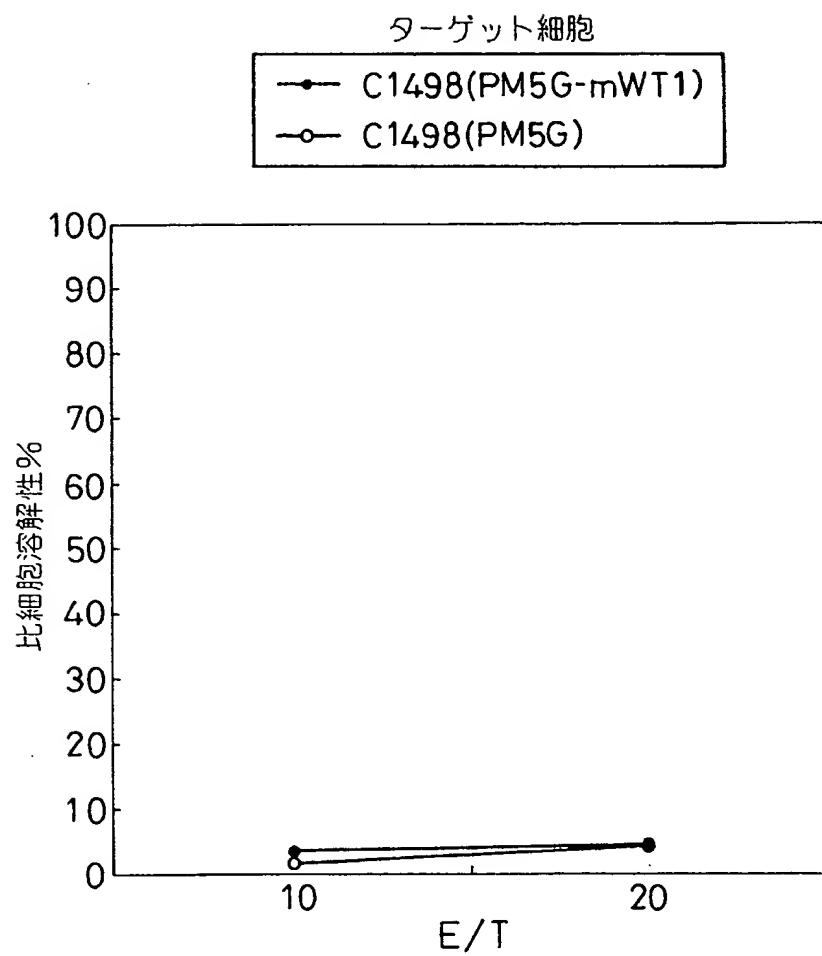


Fig.18



## S E Q U E N C E   L I S T I N G

&lt; 1 1 0 &gt;

&lt; 1 2 0 &gt;   Cancer Antigen Based on Tumor Suppressor Gene WT1

&lt; 1 3 0 &gt;   9 8 3 2 7 9

&lt; 1 6 0 &gt;   8

&lt; 2 1 0 &gt;   1

&lt; 2 1 1 &gt;   4 4 9

&lt; 2 1 2 &gt;   P R T

&lt; 2 1 3 &gt;   M o u s e

&lt; 4 0 0 &gt;   1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Ser

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro Val Ser Gly Ala

20

25

30

Arg Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala

35

40

45

Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro

50

55

60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly

65

70

75

80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe

85

90

95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe

100

105

110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe

115

120

125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Thr Ile  
 130 135 140  
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe  
 165 170 175  
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
 180 185 190  
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
 195 200 205  
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
 210 215 220  
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
 225 230 235 240  
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
 245 250 255  
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu  
 260 265 270  
 Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
 275 280 285  
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser  
 290 295 300  
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
 325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
 340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
 355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
 370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
 385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
 405 410 415

Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
 420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu His Val Ala  
 435 440 445

Leu

449

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 4 4 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > H u m a n

< 4 0 0 > 2

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro  
 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala  
 20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr  
 35 40 45



Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro  
 50 55 60  
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
 85 90 95  
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
 100 105 110  
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe  
 115 120 125  
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
 130 135 140  
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe  
 165 170 175  
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
 180 185 190  
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
 195 200 205  
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
 210 215 220  
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
 225 230 235 240  
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
 245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu  
 260 265 270  
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
 275 280 285  
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro  
 290 295 300  
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
 340 345 350  
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
 355 360 365  
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
 370 375 380  
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
 385 390 395 400  
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
 405 410 415  
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
 420 425 430  
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
 435 440 445  
 Leu  
 449  
 < 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 8

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e

< 4 0 0 > 3

Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu

1 5

< 2 1 0 > 4

< 2 1 1 > 8

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e

< 4 0 0 > 4

Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu

1 5

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e

< 4 0 0 > 5

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e

< 4 0 0 > 6

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met

1 5

< 2 1 0 > 7

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e

< 4 0 0 > 7

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5

< 2 1 0 > 8

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c P e p t i d e

< 4 0 0 > 8

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04130

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y         | Molecular and Cellular Biology, Vol. 11, No. 3 (1991)<br>Alan J. Buckler, et al., "Isolation, Characterization, and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1) During Kidney Development", p.1707-1712 | 1-7                   |
| Y         | JP, 9-104629, A (Chuzo Kishimoto, Haruo Sugiyama),<br>22 April, 1997 (22. 04. 97),<br>Full text ; Figs. 1 to 10<br>& WO, 9638176, A & EP, 841068, A<br>& AU, 9657796, A                                      | 1-6                   |
| Y         | Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993)<br>Pardoll DM, "New strategie for enhancing the immunogenicity of tumors", p.719-725   | 1-6                   |
| Y         | Current Opinion in Immunology, Vol. 5, No. 5 (1993)<br>Melief CJ, et al., "Potential immunogenicity of oncogenea and tumor suppressor gene products.", p.709-713   | 1-6                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

Date of the actual completion of the international search  
14 October, 1999 (14. 10. 99)

Date of mailing of the international search report  
2 November, 1999 (02. 11. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04130

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | Immunogenetics, Vol. 41, No. 4 (1995) Rammensee HG, et al., "MHC ligands and peptide motifs: first listing.", p.178-228   | 1-6                   |
| PY        | Proceeding of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, Vo. 40 (March, 1999)<br>Gaiger A, et al., "WT1: A new leukemia and cancer antigen.", p.424 | 7                     |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C07K14/82, C07K7/00, C12N15/00, A61K39/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y               | Molecular and Cellular Biology, 第11巻, 第3号. (1991)<br>Alan J. Buckler, et. al. 「Isolation, Characterization,<br>and Expression of the Murine Wilms' Tumor Gene (WT1)<br>During Kidney Development」, p. 1707-1712 | 1-7              |
| Y               | J P, 9-104629, A (岸本忠三、杉山治夫)<br>22. 4月. 1997 (22. 04. 97)<br>全文, 第1-10図<br>& WO, 9638176, A & EP, 841068, A<br>& AU, 9657796, A   | 1-6              |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 10. 99

国際調査報告の発送日

02.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

斉藤 真由美

4 N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | Current Opinion in Immunology, 第5巻, 第5号. (1993)<br>Pardoll DM, 「New strategie for enhancing the immunogenicity<br>of tumors」, p. 719-725                                | 1 - 6            |
| Y                     | Current Opinion in Immunology, 第5巻, 第5号. (1993)<br>Melief CJ, et. al., 「Potential immunogenicity of oncogenea an<br>d tumor suppressor gene products.」, p. 709-713      | 1 - 6            |
| Y                     | Immunogenetics, 第41巻, 第4号. (1995)<br>Rammensee HG, et. al., 「MHC ligands and peptide motifs:<br>first listing.」, p. 178-228   | 1 - 6            |
| P Y                   | Proceeding of the American Associaion for Cancer Research<br>Annual Meeting, 第40巻 (3月. 1999)<br>Gaiger A, et. al., 「WT1: A new leukemia and cancer antigen.」,<br>p. 424 | 7                |